



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112725343 B

(45) 授权公告日 2024.10.11

(21) 申请号 202110086530.2

(22) 申请日 2021.01.22

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112725343 A

(43) 申请公布日 2021.04.30

(73) 专利权人 南京工业大学
地址 211899 江苏省南京市江北新区浦珠
南路30号

(72) 发明人 王玉珍 赵桥

(74) 专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限
公司 32224

专利代理师 王玉

(51) Int. Cl.

C12N 15/115 (2010.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(56) 对比文件

KR 20130123766 A, 2013.11.13

Xiangxiang Zhao等. A versatile biosensing platform coupling CRISPR-Cas12a and aptamers for detection of diverse analytes. Sci Bull (Beijing). 2020, 第66卷 (第1期), 第71页右栏.

审查员 韩沛

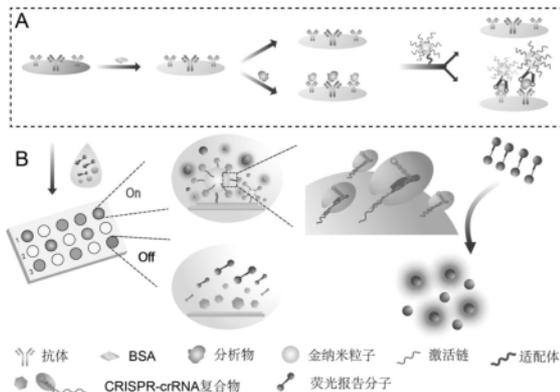
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称

联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测试剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及化学、生物技术领域,具体涉及了一种联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测方法。将免疫分析、纳米技术和CRISPR检测技术三者相结合,通过在金纳米粒子上共价连接适配体和CRISPR激活链得到金纳米探针。通过抗体与适配体对蛋白标志物的特异性识别作用,在96孔酶标板中形成抗体-分析物-金纳米探针的夹心结构。金纳米探针上的激活链可以激活CRISPR蛋白的旁切割活性,切割荧光报告分子产生荧光信号,从而对分析物进行定量检测。本发明利用金纳米探针实现了分析物识别信号到CRISPR旁切割活性信号的转化,同时实现了激活链信号的放大。所述检测方法操作简单、灵敏度高、特异性强和检测线性范围宽。



1. 一种金纳米探针,其特征在於,所述金纳米探针由适配体和激活链同时共价连接到金纳米粒子上;

所述金纳米粒子、适配体、激活链的摩尔比为1:50:50、1:50:100、1:50:500、1:50:1000中的一种;

所述激活链为单链DNA、双链DNA或单链RNA的其中一种;

所述激活链能够激活CRISPR蛋白的旁路核酸切割活性;

所述适配体为单链DNA或单链RNA中的其中一种;所述激活链和适配体均为5'端修饰SH C₆的寡核苷酸链。

2. 根据权利要求1所述的金纳米探针的构建方法,其特征在於,将金纳米粒子、适配体和激活链通过共价连接得到。

3. 一种联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测试剂盒,其特征在於,包括CRISPR试剂、阳性标准品和权利要求1所述的金纳米探针。

4. 一种联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测方法,其特征在於,包括以下步骤:

将抗体包埋在酶标板中,分步加入作为分析物的蛋白标志物和权利要求1所述的金纳米探针,通过抗体与适配体对蛋白标志物的特异性识别作用,形成抗体-蛋白标志物-金纳米探针的夹心的结构;

将CRISPR试剂加入到上述反应体系中,金纳米探针上的激活链与CRISPR中的crRNA特异性结合,激活CRISPR蛋白的旁切割活性,任意切割荧光报告分子产生荧光信号,使用酶标仪进行检测,实现对蛋白标志物的定量分析;

所述CRISPR试剂包括CRISPR蛋白、crRNA和荧光报告分子;

所述荧光报告分子为两端分别修饰有荧光基团和荧光猝灭基团的核酸链,所述核酸链为单链DNA或者单链RNA中的其中一种。

5. 根据权利要求4所述的联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测方法,其特征在於,具备所述旁切割活性的CRISPR蛋白为Cas12a、Cas12b、Cas13a、Cas13b、Cas14、Csm6中的其中一种。

联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化学、生物技术领域,具体涉及一种联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 近些年来,CRISPR系统的发现和研究为核酸检测提供了全新的方法,这些方法主要依靠荧光信号来检测样品中目标核酸分子的浓度。目前用于核酸检测的CRISPR蛋白有Cas12a、Cas12b、Cas13a、Cas13b、Cas14和Csm6等具有旁路切割活性的Cas蛋白。其中Cas12a蛋白分子与crRNA结合,形成crRNA-Cas12a复合体,目标单链DNA分子或者双链DNA分子与crRNA特异性结合,激活CRISPR蛋白的旁路核酸切割活性,任意切割单链DNA分子;此外,Cas13a蛋白形成crRNA-Cas13a复合体后,特异性结合目标单链RNA分子,激活旁路核酸切割活性,任意切割单链RNA分子;Cas14形成crRNA-Cas14复合体后,特异性结合目标单链DNA分子,激活旁路核酸切割活性,任意切割单链DNA分子。由于它们进行检测的原理大都相似,其它基于激活CRISPR蛋白旁路切割活性的检测原理不再赘述。除核酸检测外,CRISPR蛋白也逐渐被应用于检测其他分子,这些策略需要借助媒介将分析物的识别信号转化为CRISPR蛋白的旁路切割活性信号,CRISPR的旁路切割活性是由其目标核酸链(激活链)激活的。通常为了提高检测的灵敏度,在进行CRISPR反应前会将激活链进行核酸扩增,常用的扩增方法有聚合酶链式反应(PCR)、重组酶聚合酶扩增(RPA)、环介导等温扩增(LAMP)等,然而这些方法通常需要使用专门的仪器、成本较高且易导致样品间的交叉污染。另外,将分析物的识别信号转化为CRISPR旁路切割活性信号、激活链核酸扩增这两部分通常是分步进行的,这使得操作程序更为复杂。最后,为了检测不同的分析物,通常需要有针对性的设计不同的激活链和crRNA,这使得操作程序更为复杂,且增加反应成本。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的缺陷,提供一种联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测试剂盒及检测方法,利用一种修饰有激活链和适配体的金纳米探针。一方面,通过适配体对分析物的特异性识别,可实现分析物识别信号到CRISPR旁路切割活性信号的转化;另一方面,金纳米探针上连接了大量的激活链,可用来代替PCR、LAMP等核酸扩增步骤。

[0004] 为此,本发明采用以下技术方案:

[0005] 第一方面,本发明提供了一种金纳米探针,所述金纳米探针由适配体和激活链同时共价连接到金纳米粒子上。

[0006] 其中,所述适配体为单链DNA或单链RNA中的其中一种。

[0007] 其中,所述适配体包括但不限于PSA(前列腺癌特异性抗原)适配体,PSA适配体也可以替换成CEA(癌胚抗原)适配体,用来检测待测样本中的CEA的含量;PSA适配体也可替

换成其它蛋白标志物的适配体或者对其它生物分子的适配体。

[0008] 其中,所述激活链为单链DNA、双链DNA或单链RNA的其中一种。

[0009] 其中,所述激活链可激活CRISPR蛋白的旁路核酸切割活性。

[0010] 其中,所述适配体和激活链均为5'端修饰SH C₆的核酸链。

[0011] 第二方面,本发明内容还包括所述金纳米探针的构建方法:将金纳米粒子与适配体和激活链通过共价连接得到金纳米探针。

[0012] 所述金纳米探针通过金纳米粒子与适配体和激活链以不同摩尔比反应制备,例如可以是1:50:50、1:50:100、1:50:500;1:50:1000中的一种,优选为1:50:100。

[0013] 第三方面,本发明内容提供了一种联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测方法,包括如下步骤:

[0014] (1) 在96孔酶标板中形成抗体-分析物-金纳米探针的夹心结构。

[0015] (2) 将CRISPR试剂加入上述反应体系,金纳米探针上的激活链会激活CRISPR蛋白的旁切割活性,切割荧光报告分子产生荧光信号,使用酶标仪对分析物进行定量分析。

[0016] 其中,所述CRISPR试剂包括CRISPR蛋白、crRNA和荧光报告分子。

[0017] 其中,所述具备旁切割活性的CRISPR蛋白为Cas12a、Cas13a、Cas14a、Cas12b、Cas13b、Csm6中的其中一种。

[0018] 本发明不仅限于在Cas12a上的使用,Cas13a、Cas14a、Cas12b、Cas13b、Csm6等具有旁路核酸切割活性的Cas蛋白同样使用;同样亦适用于小分子、细菌、细胞等其它分析物的检测。

[0019] 其中,所述荧光报告分子为两端分别修饰有荧光基团和荧光猝灭基团的核酸链。

[0020] 其中,所述荧光报告分子中的核酸链为单链DNA或者单链RNA中的其中一种。

[0021] 本发明中,通过在金纳米粒子表面共价连接适配体和激活链形成金纳米探针。一方面,适配体可特异性识别分析物,形成抗体-分析物-金纳米探针的夹心结构;另一方面,具有旁切割活性的CRISPR蛋白与crRNA结合成为一个蛋白核酸复合物,该复合物可以被金纳米探针表面固定的激活链进行靶向结合,释放出旁路切割活性,切割体系中的荧光报告分子产生荧光信号,从而实现了对分析物的检测。

[0022] 优选地,本发明所述CRISPR蛋白为Cas12a蛋白,Cas12a可以识别目标单链DNA并任意切割单链DNA,操作更加稳定、简单。

[0023] 优选地,所述荧光报告分子的工作浓度为0~200nM,例如可以是0nM、50nM、100nM、150nM或200nM等,优选为150nM。

[0024] 优选地,所述CRISPR检测反应时间为30~150min,例如可以是30min、60min、90min、120min或150min等,优选为120min。

[0025] 作为本发明的优选的技术方案,所述Cas12a的最终工作浓度为20nM,所述crRNA的最终工作浓度为250nM。

[0026] 作为本发明优选的技术方案,所述荧光报告分子中的核酸链为单链DNA。

[0027] 作为本发明优选的技术方案,所述联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测方法包括如下步骤:

[0028] (1) 制备金纳米探针:将金纳米粒子与适配体、激活链共价连接得到金纳米探针。

[0029] 其中,所述金纳米粒子采用柠檬酸钠还原法制得,所述适配体和激活链在与金纳

米粒子反应前先用TECP活化。

[0030] (2) 夹心结构的形成:先将抗体包埋在96孔酶标板中,再依次分步加入分析物、金纳米探针,形成抗体-分析物-金纳米探针的夹心结构。

[0031] (3) CRISPR反应:将CRISPR试剂加入到上述反应体系,反应120min,通过酶标仪测量荧光强度,实现分析物的定量分析。

[0032] 第四方面,本发明提供一种联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测试剂盒,所述试剂盒包括上述的金纳米探针、CRISPR试剂和阳性标准品。

[0033] 与现有技术相比,本发明至少具有以下有益效果:

[0034] 本发明是将酶联免疫检测、纳米技术与CRISPR检测技术相结合,利用抗体和适配体对分析物特异性识别的原理,在特定抗体和适配体存在下,形成抗体-分析物-金纳米探针夹心结构,最后再结合CRISPR检测技术,对分析物进行定量分析。整个过程操作简单、灵敏度高、检测线性范围宽。

[0035] 本发明引入了一种金纳米探针,它是通过将适配体和激活链共价连接到金纳米粒子上得到的。适配体可特异性识别分析物;激活链可激活CRISPR蛋白的旁路切割活性,任意的切割荧光报告分子产生荧光信号。通过金纳米探针,一方面,实现了分析物识别信号转化为CRISPR的旁切割活性信号;另一方面,丰富的激活链可代替PCR、LAMP等核酸扩增步骤,降低了成本并能防止样品间的交叉污染。且这两方面可同时实现,使得操作过程更加简单。

[0036] 本发明所述的联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测方法,通过更换金纳米探针上的适配体可以推广到更多分析物的定量检测,无需更换激活链和相应的crRNA,简化了操作流程。

附图说明

[0037] 图1为本发明提供的联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测方法的原理示意图;

[0038] 图2为本发明所述的金纳米探针的合成原理示意图;

[0039] 图3为本发明所述的金纳米粒子的透射电镜表征图;

[0040] 图4为本发明所述的金纳米粒子及金纳米探针的紫外表征图;

[0041] 图5为本发明的CEA的标准曲线图;

[0042] 图6为本发明的PSA的标准曲线图。

具体实施方式

[0043] 下面结合附图对本发明作进一步描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,而不能以此来限制本发明的保护范围。

[0044] 缩略语对照表:

[0045]

BSA	牛血清白蛋白
TCEP	三(2-羧乙基)膦盐酸盐
PBS	磷酸缓冲盐溶液
CRISPR	成簇的、规律间隔的短回文重复序列
crRNA	CRISPR RNA

Cas	CRISPR-associated蛋白
-----	---------------------

[0046] 通过图1简单描述本发明联合金纳米探针和CRISPR-Cas的蛋白标志物检测方法的原理:

[0047] 首先,如图1中A部分的描述,在96孔酶标板中包埋抗体、分步加入待测样品、金纳米探针,若待测样品中含有分析物,通过抗体与适配体对分析物的特异性识别作用,会形成抗体-分析物-金纳米探针的夹心结构;如图1中B部分所示,随后加入CRISPR试剂,金纳米探针上的激活链可与crRNA特异性结合,激活CRISPR蛋白的旁切割活性,切割荧光报告分子产生荧光信号,对反应体系中的荧光强度进行检测,进而实现对分析物的定量分析。

[0048] 实施例1

[0049] 本实施例中,以CEA作为分析物,对其进行定量分析。

[0050] 1. 金纳米探针的制备

[0051] 金纳米探针的制备流程如图2所示,将CEA适配体和激活链在室温下用10mM的TECP活化1小时,随后将它们加入到金纳米粒子溶液中,在室温下震荡反应16小时。随后分六次加入1M的NaCl溶液,使其最终浓度为0.1M,在室温下震荡不低于24小时,得到金纳米探针,10000r/min 10min离心除去多余的核酸,用PBS(0.01M, pH 7.4)缓冲液洗涤三次,复重新分散到PBS(0.01M, pH 7.4)缓冲液中,4°C避光存储备用。如图3紫外表征,表明金纳米探针的成功制备。

[0052] 所述CEA适配体的序列为:

[0053] 5' -SH-C₆-TTTTTTTTTTAACTTATTCGACCATA-3'

[0054] 所述激活链的序列为:

[0055] 5' -SH-C₆-TTTTTTTTTTGGCCAGTACCTCATGGAT-3'

[0056] 所述金纳米粒子:CEA适配体:激活链摩尔比为1:50:100。

[0057] 所述金纳米粒子的制备方法:将玻璃器皿在使用前用王水(HNO₃:HCl=3:1)浸泡,之后用大量的水冲洗。将2mL 50mM的氯金酸溶液添加到98mL的超纯水中,在烧瓶中加热至回流,当溶液开始回流时,迅速将10mL 38.8mM的柠檬酸钠加入烧瓶中,颜色由淡黄色变为鲜红色,说明金纳米粒子的形成。让混合物再回流20分钟,然后在搅拌下冷却室温。所得溶液在4°C避光保存,以备后续使用。图4为金纳米粒子的透射电镜表征图。

[0058] 2. 夹心结构的形成

[0059] 将100μL 10μg/mL的CEA包被抗体加入96孔酶标板中,在4°C孵育过夜后用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板;加入200μL的封闭缓冲液,在37°C下孵育1h进行封闭处理,再次用洗涤缓冲液冲洗;之后加入100μL不同浓度的CEA分析物,在37°C下孵育1h,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板;最后加入上述金纳米探针,在37°C下孵育1h,形成抗体-CEA-金纳米探针夹心结构,用洗涤缓冲液冲洗96孔酶标板。

[0060] 所述CEA购买于上海领潮生物科技有限公司,用PBS(0.01M, pH 7.4)缓冲液稀释成不同的浓度:0、0.03、0.06、0.3、0.6、3、6、18、30、60、90、120ng/mL。

[0061] 所述洗涤缓冲液是含有0.05% Tween-20的0.01M pH7.4的PBS缓冲液。

[0062] 所述封闭缓冲液是含有0.1% BSA的0.01M pH7.4的PBS缓冲液。

[0063] 3. 基于CRISPR的荧光激活反应

[0064] 荧光激活反应在100μL的CRISPR试剂中进行,包括1×NEB 2.1缓冲液、20nM

Cas12a蛋白、250nM crRNA、150nM荧光报告分子。将CRISPR试剂加入到形成夹心结构的96孔酶标板中,在37°C孵育120min,测量荧光强度。荧光信号可以通过酶标仪进行读取,也可用便携的手持紫外仪通过肉眼直接观察,荧光基团的激发波长和发射波长分别为480nm及520nm。

[0065] 所述NEB 2.1缓冲液、Cas12a蛋白均购买自New England Biolabs (NEB) 公司。

[0066] 所述荧光报告分子的序列为:5' -6-FAM-TTATT-BHQ1-3'

[0067] 所述crRNA的序列为:

[0068] 5' -UUUCUACUAAGUGUAGAUAUCCAUGAGGUACUACUGGCCAA-3'

[0069] 4. 实验结果

[0070] 图5显示了CEA的标准曲线图,由图可知,检测体系的信号随着CEA分析物的增加而增强,且在0.6~120ng/mL有良好的线性关系。

[0071] 实施例2

[0072] 本实施例中,以PSA作为分析物,对其进行定量分析。

[0073] 与实施例1的区别在于,用PSA适配体替换CEA适配体,用PSA的特异性包被抗体替换CEA的特异性包被抗体。

[0074] 所述PSA适配体的序列为:

[0075] 5' -SH-C₆-TTTTTAATTAAAGCTCGCCATCAAATAGC-3'

[0076] 所述PSA购买于上海领潮生物科技有限公司,用PBS (0.01M, pH 7.4) 缓冲液稀释成不同的浓度:0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、30、50、70、100、150ng/mL。

[0077] 图6显示了PSA的标准曲线图,由图可知,检测体系的信号随着PSA分析物的增加而增加,且在0.5~150ng/mL有良好的线性关系。

[0078] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明技术原理的前提下,还可以做出若干改进和变形,这些改进和变形也应视为本发明的保护范围。

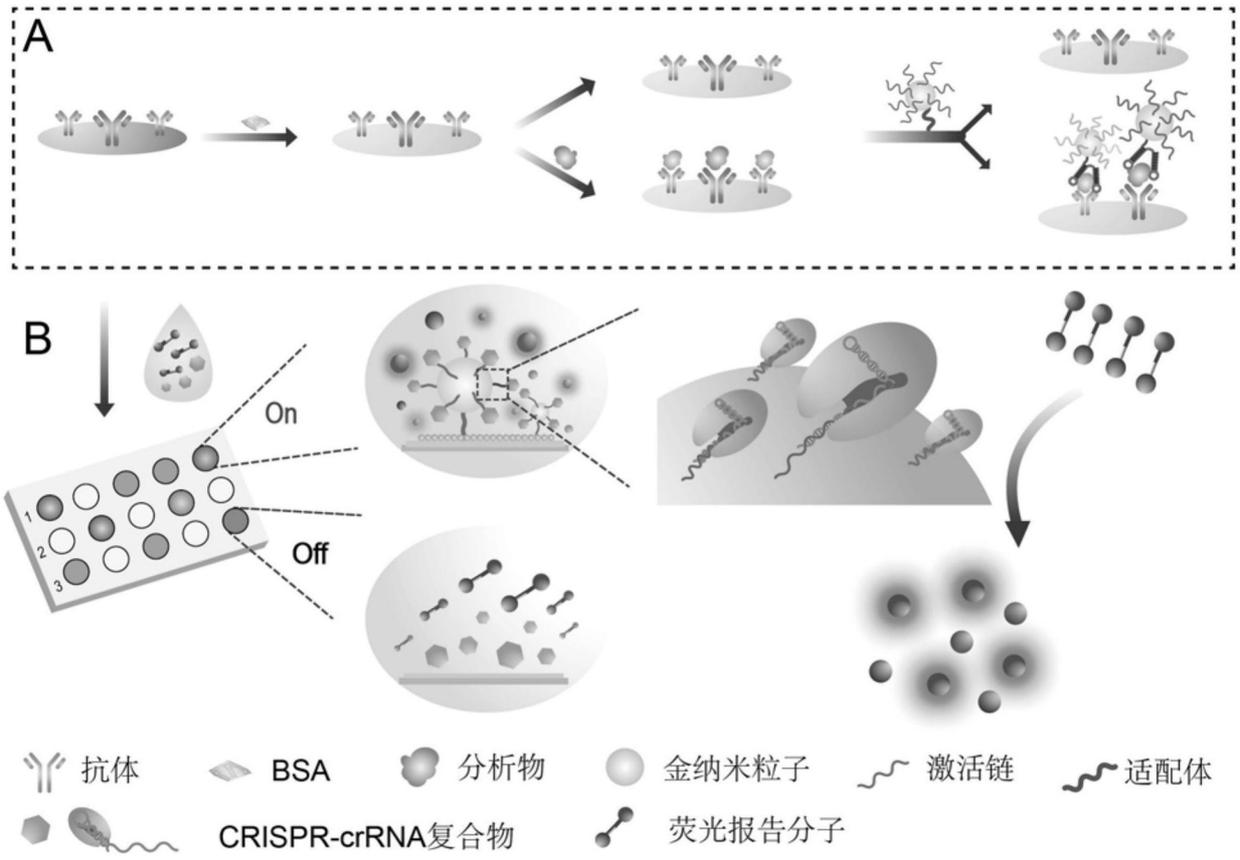


图1

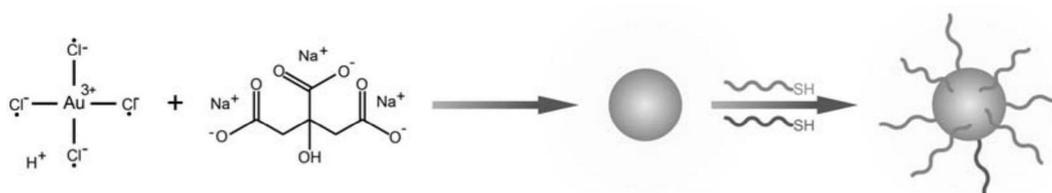


图2

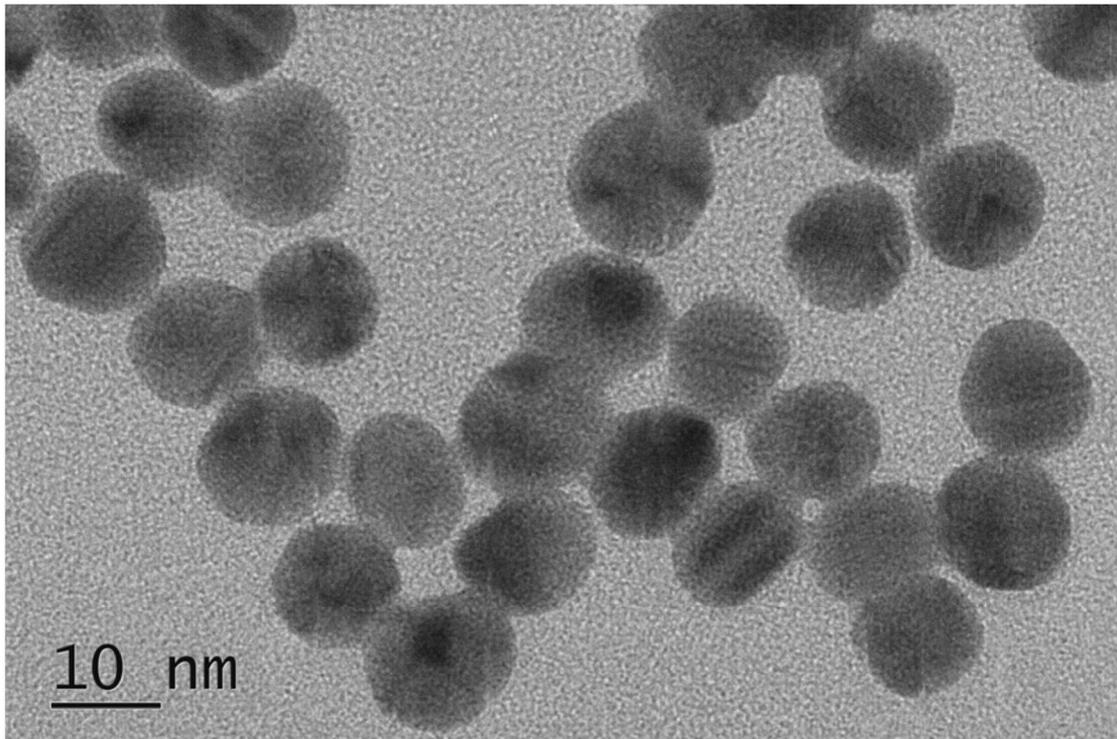


图3

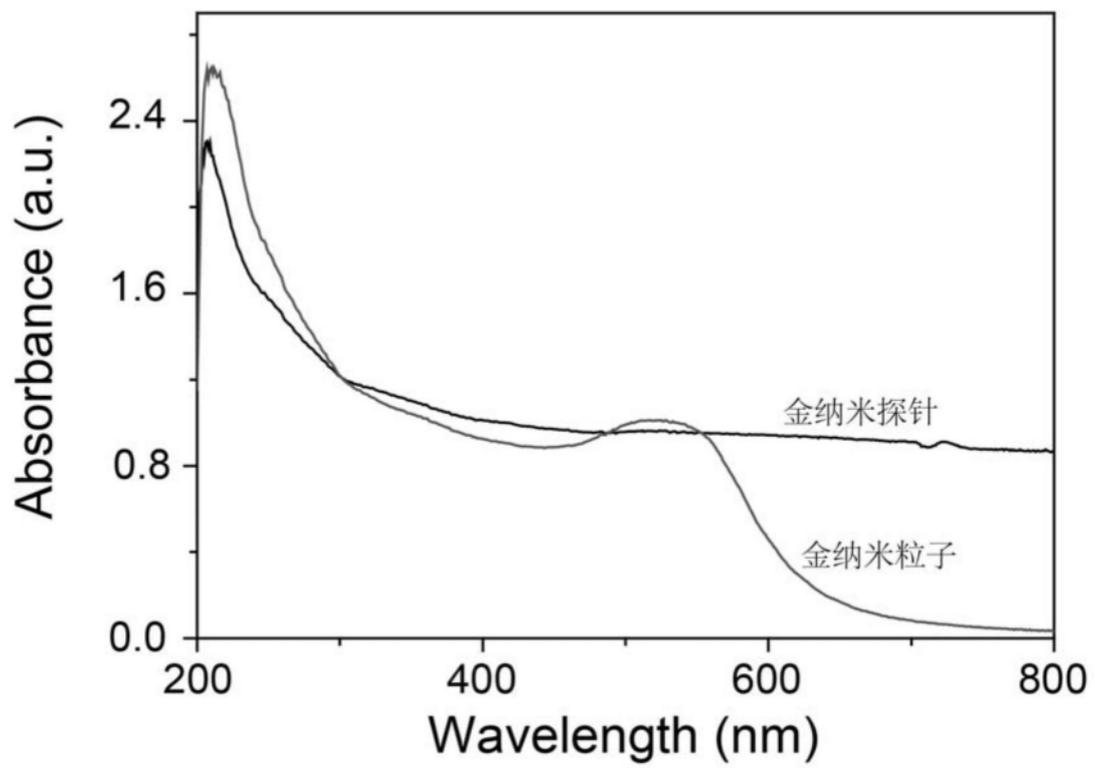


图4

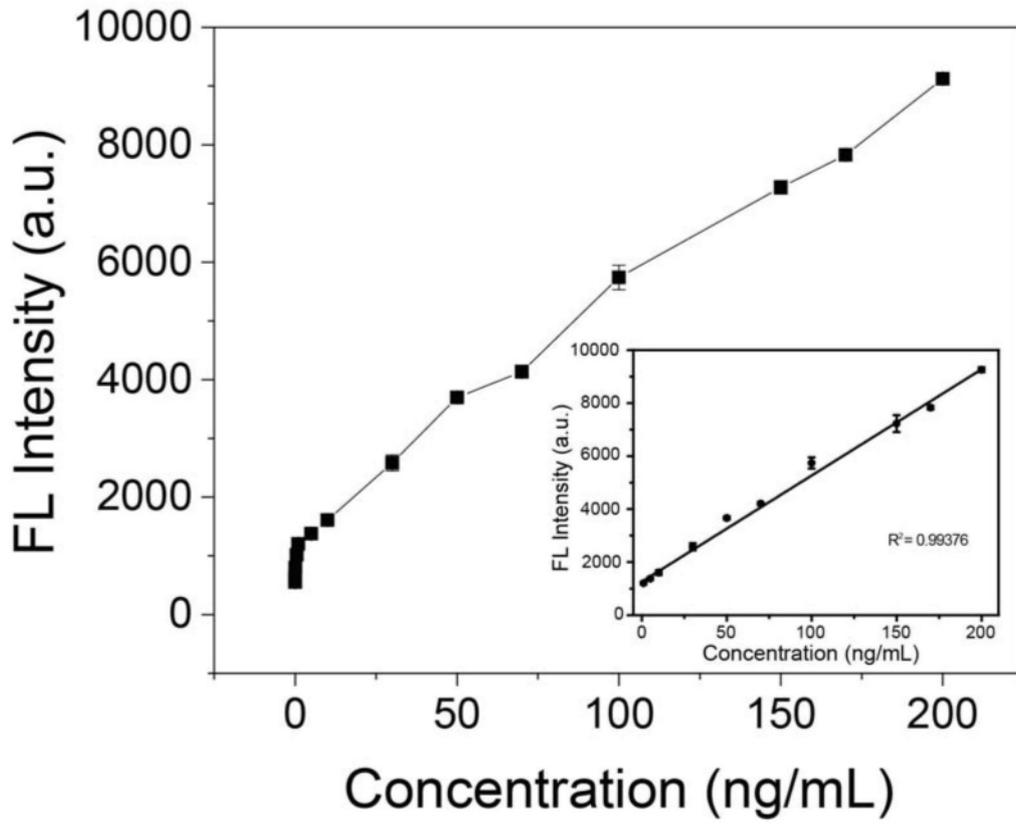


图5

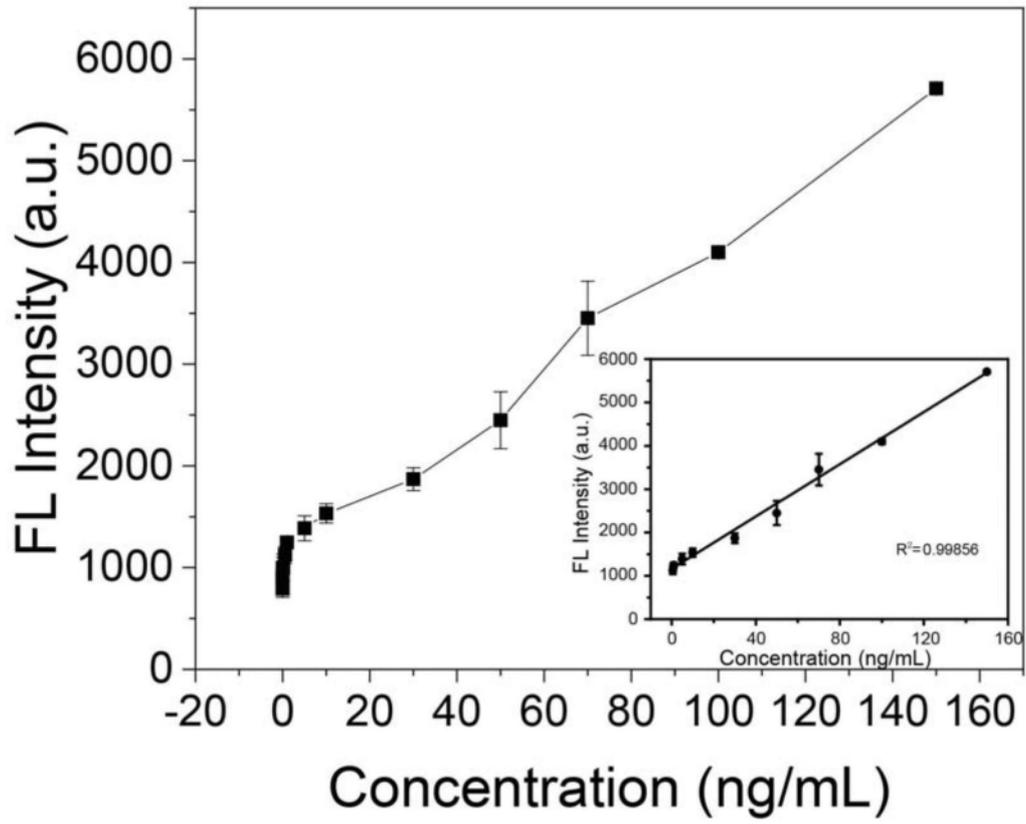


图6